

Polysaccharides containing alpha-1,4-glucan chains and method for producing same

Patent number: JP2002533132T

Publication date: 2002-10-08

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: C12P19/18; C12P19/00; (IPC1-7): C12N9/10; C12P19/18; C12R1/01; C12P19/18; C12R1/01

- european: C12P19/18

Application number: JP20000591211T 19991130

Priority number(s): DE19981060376 19981228; WO1999EP09299 19991130

Also published as:



WO0039321 (A1)



EP1141370 (A1)



US6677142 (B1)



DE19860376 (A1)



EP1141370 (B1)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2002533132T

Abstract of corresponding document: **US6677142**

The invention relates to a method for producing polysaccharides containing alpha-1,4-glucan chains. According to the inventive method, a glucosyl group acceptor undergoes a chain prolongation reaction by reacting it with saccharose in the presence of an amylosaccharase. The amount of the glucosyl group acceptor in the reaction mixture is chosen in such a way that the mole ratio of the available ends of the glucosyl group acceptor to the saccharose is at least 1:1,000 and/or the weight ratio of the glucosyl group acceptor to the saccharose is at least 1:0.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-533132

(P2002-533132A)

(43)公表日 平成14年10月8日 (2002.10.8)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 P 19/18
// C 12 N 9/10
(C 12 N 9/10
C 12 R 1:01)
(C 12 P 19/18

識別記号

F I
C 12 P 19/18
C 12 N 9/10
(C 12 N 9/10
C 12 R 1:01)
(C 12 P 19/18

テマコード (参考)
4 B 0 5 0
4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-591211(P2000-591211)
(86) (22)出願日 平成11年11月30日 (1999.11.30)
(85)翻訳文提出日 平成13年6月25日 (2001.6.25)
(86)国際出願番号 PCT/EP99/09299
(87)国際公開番号 WO00/39321
(87)国際公開日 平成12年7月6日 (2000.7.6)
(31)優先権主張番号 19860376.2
(32)優先日 平成10年12月28日 (1998.12.28)
(33)優先権主張国 ドイツ (DE)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, CZ, HR, HU, JP, KR, NO, PL, RU, US, ZA

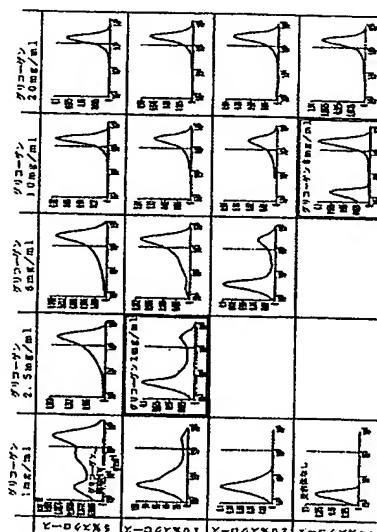
(71)出願人 セラニーズ ベンチャーズ ゲー・エム・ペー・ハー
ドイツ国 ディー-65926 フランクフルト アム マイン インドウストリーバルク ヘキスト
(72)発明者 ヴァイスミュラー、マックス
ドイツ国 デー-65830 クリフテル ケーニッヒスベルゲル シュトラーセ 47
(72)発明者 クワンツ、マルティン
ドイツ国 デー-10557 ベルリン オッペルネル シュトラーセ 34
(74)代理人 弁理士 藤本 英介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 α -1, 4-グルカン鎖含有多糖およびその製造方法

(57)【要約】

本発明は、 α -1, 4-グルカン鎖を含有する多糖の製造方法に関する。本発明の方法によると、グルコシル基受容体は、アミロスクラーゼの存在下でサッカロースと反応させて、変換させることによって鎖伸長反応を受ける。反応混合物中におけるグルコシル基受容体の量は、グルコシル基受容体の利用可能な末端とサッカロースとのモル比が少なくとも1:1, 000であり、および/またはグルコシル基受容体とサッカロースとの重量比が少なくとも1:50であるように選択される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 α -1, 4-グルカン鎖含有多糖の製造方法であって、アミロスクラーゼの存在下におけるスクロースとの反応による鎖伸長反応を受けるグルコシル基受容体を含み、反応混合物中におけるグルコシル基受容体の量が、鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端とスクロースとのモル比が少なくとも1:1000であり、および／またはグルコシル基受容体とスクロースとの重量比が少なくとも1:50であるように選択されている α -1, 4-グルカン鎖含有多糖の製造方法。

【請求項2】 鎮の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端とスクロースとのモル比が少なくとも5:1000であり、好ましくは少なくとも1:100である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 フルクトースが反応混合物に添加される請求項1または2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】 α -1, 4-グルカン鎖含有多糖の製造方法であって、グルコシル基受容体がアミロスクラーゼの存在下において、フルクトースが添加された状態でスクロースとの反応による鎖伸長反応を受ける方法。

【請求項5】 フルクトースは少なくとも10mMの濃度で反応混合物に添加される請求項3または4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 フルクトースは少なくとも50mMの濃度で反応混合物に添加され、好ましくは100mMから800mMの濃度で反応混合物に添加される請求項3から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 使用されるアミロスクラーゼはナイセリア属の細菌から得られるアミロスクラーゼである請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 使用されるアミロスクラーゼはナイセリアポリサッカレア(*Neisseria polysaccharea*)種の細菌から得られるアミロスクラーゼである請求項7に記載の方法。

【請求項9】 使用されるグルコシル基受容体は、デキストリン、アミロース、アミロペクチンまたはグリコーゲンである請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 多糖製造時の分子量を制御するための請求項1から9のいずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項11】 請求項1から9のいずれか1項に記載の方法により得られる α -1, 4-グルカン鎖含有多糖。

【請求項12】 請求項11に記載された α -1, 4-グルカン鎖含有多糖の錠剤充填剤としての使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 $\alpha-1$ 、4-グルカン鎖含有多糖およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

多糖は、多数のグリコシド結合した単糖から構成されるポリマーである。多糖は、高等生物および細菌などの微生物の両方に存在し、例えば、貯蔵および骨格物質の機能を果たしている。多糖は、特に、食品産業、軽工業、健康管理および分析における補助剤および添加物として商業的に使用されている。

【0003】

グルカンは、グルコースモノマーのみからなる多糖である。 $\alpha-1$ 、4-グルカンにおいて、これらのグルコース基は $\alpha-1$ 、4-グリコシド結合で互いに連結されている。 $\alpha-1$ 、4-グルカンは、その物理化学的性質のために、無色無臭無味で、非毒性かつ生分解性であるフィルムを製造するために使用することができる。既に、例えば、食品産業、繊維産業およびガラス繊維産業においてそのようなフィルムに関する適用が多数なされている。

【0004】

最も高頻度に存在する天然の $\alpha-1$ 、4-グルカンは、デンプンの構成成分であるアミロースである。アミロースは、その性質が天然のセルロース繊維の性質と類似し、かつその性質により製紙においてその部分的な代替または完全な代替が可能である繊維を製造するために既に使用されている。薬学では、アミロースは、錠剤、ペースト剤に対する充填剤として、皮膚保護物質への添加物として使用されている。食品産業では、アミロースは、ブディング、スープ、ソース、マヨネーズ、クリーム充填のための増粘剤および結合剤として、ゼラチン代用品として使われている。アミロースは、また、遮音壁パネルを製造する際に結合剤として使用されている。

【0005】

デンプンの主要な構成成分であるアミロペクチンおよびグリコーゲンは、その

主鎖が $\alpha-1, 4$ -グリコシド結合を有するグルコース基からなるさらなる多糖である。これらの多糖は、 $\alpha-1, 6$ -グリコシド結合を介して主鎖に連結している側鎖を有する。これらの多糖もまた産業界では広範囲に使用されている。

【0006】

デンプンおよびグリコーゲンなどの $\alpha-1, 4$ -グルカンを植物および動物から単離することは複雑で、費用がかかり、そして再現可能な性質を有する製品には必ずしも至っていない。このため、そのようなグルカンを产生し得る細菌がますます注目されている。

【0007】

大部分の細菌において、多糖は、ヌクレオチドで活性化された糖を介して、高等生物の場合と類似した方法で合成されている。従って、例えば大部分の細菌では、グリコーゲンの生合成には3つの酵素が関与する。すなわち、グルコース-1-リン酸およびATPからのADP-グルコースの生成を触媒するADP-グルコースホスホリラーゼ、グルコースをADP-グルコースから成長中のグルカン鎖に転移するグリコーゲンシンターゼ、および $\alpha-1, 6$ -結合を線状の $\alpha-1, 4$ -グルカン鎖に導入する分枝酵素。しかし、細菌の中には、多糖の合成が、活性化された糖が関与することなく行われるもののがいくつもある。

【0008】

ヌクレオチド糖が関与することなく多糖を合成し得る細菌システムの1つが、ナイセリア属の細菌で見出された。これらの細菌では、グリコーゲンに類似した構造を有する多糖が、酵素の天然基質であるスクロースからアミロスクラーゼ酵素により直接的に合成されている [Okada, G. および E. J. Hehre, J. Biol. Chem. 249: 126~135 (1974); Mackenzie, C. R. ら, Can. J. Microbiol. 23: 1303~1307 (1977); Mackenzie, C. R. ら, Can. J. Microbiol. 24: 357~362 (1978)]。

アミロスクラーゼ (スクロース: 1, 4- α -グルカン 4- α -グルコシルトランスフェラーゼ、E. C. 2. 4. 1. 4.) は、下記の反応式に従ってD-フルクトースの遊離を伴ってスクロース分子のグルコシル基を成長中のポリマー

鎖に転移し、 $\alpha-1$ 、4-グルコシド結合グルカンの生成を触媒する：

スクロース + ($\alpha-1$, 4-D-グルコシル) $n \rightarrow$ D-フルクトース + ($\alpha-1$, 4-D-グルコシル) $n+1$

【0009】

ヌクレオチド活性化糖または補助因子は、この反応では必要とされない。しかし、この酵素は、 $\alpha-1$, 4-グルカン鎖の伸長に関する上記の反応式に従ってスクロースのグルコシル基が転移されるグルコシル基受容体（またはプライマー）、例えば、オリゴ糖およびアミロースまたはグリコーゲンなどの多糖の存在によって刺激される [Okada, G. および E. J. Hehre, J. Biol. Chem. 249: 126~135 (1974) ; Remaud-Simeon, M. ら、S. B. Petersen, B. Svenson および S. Pedersen (編者)、Carbohydrate bioengineering, 313~320 頁 (1995) ; Elsevier Science B. V. 、Amsterdam, Netherlands]。

【0010】

アミロスクレーゼは、今まで、ナイセリア属の細菌にのみ見出されている。細菌において構成的に発現する該酵素は極めて安定であり、その重合生成物に非常に強固に結合している。調べた大部分の種において、該酵素は細胞内に局在化しているが、ナイセリアポリサッカレア (Neisseria polysaccharaea) の場合、アミロスクレーゼが分泌される。ナイセリアポリサッカレアのアミロスクレーゼ遺伝子がそのうちに単離され、遺伝子工学的方法を使用して発現されている。該酵素は、高い確率で線状の $\alpha-1$, 4-グルカン鎖の形成だけを触媒することが見出されている (WO 95/31553)。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

線状の $\alpha-1$, 4-グルカンを製造するために、N. polysaccharaea のアミロスクレーゼを使用することは、既に WO 95/31553 に提案されている。しかし、多糖を製造するためにアミロスクレーゼを使用する際の問題は、アミロスクレーゼが存在するもとで通常形成される多糖は分子量が非常に変

動しやすいということ、すなわち、大きな多分散度または広い分子量分布を有することである。しかし、工業的に応用する場合、その物理化学的性質がより均質であるため、できる限り均一な分子量、すなわち小さい多分散度を有する多糖調製物が望ましい。

【0012】

従って、本発明の目的は、多分散度が小さい $\alpha - 1$ 、4-グルカン鎖含有多糖を提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

この目的は、請求項に記載される方法および多糖によって達成される。

【0014】

従って、本発明は、アミロスクラーゼの存在下におけるスクロースとの反応による鎖伸長反応を受けるグルコシル基受容体を含み、反応混合物中におけるグルコシル基受容体の量が、鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端とスクロースとのモル比が少なくとも 1 : 1000 であり、および／またはグルコシル基受容体とスクロースとの重量比が少なくとも 1 : 50 であるように選択されている方法に関する。

【0015】

本発明はまた、アミロスクラーゼの存在下において、フルクトースが添加された状態でスクロースとの反応による鎖伸長反応をグルコシル基受容体に受けさせる方法に関する。

【0016】

これらの方法により得られる $\alpha - 1$ 、4-グルカン鎖含有多糖もまた本発明の主題である。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明において使用されるグルコシル基受容体は、 $\alpha - 1$ 、4-グルカン鎖の合成、すなわち $\alpha - 1$ 、4-グルカン鎖の伸長が、スクロースに由来する $\alpha - D$ - グルコシル基のアミロスクラーゼにより触媒される転移のもとで進行できる化

合物である。好適なグルコシル基受容体は、特に、 $\alpha-1, 4$ -グルコシド結合を介して連結している末端グルコース基を有する短鎖およびより長い鎖のオリゴ糖および多糖である。好ましくは、本発明において使用されるグルコシル基受容体は、線状のオリゴ糖または多糖であり、特に好ましくは分枝のあるオリゴ糖または多糖である。本発明のグルコシル基受容体の例としては、マルトペンタオース、マルトヘキサオースまたはマルトヘプタオースなどのマルトオリゴ糖である。

【0018】

好ましいグルコシル基受容体は、例えばトウモロコシおよびジャガイモから得られるデキストリン、アミロペクチン、アミロースおよびアミロース様多糖、および、例えば筋肉組織、イガイまたは細菌から得られるグリコーゲンおよびグリコーゲン様多糖である。

【0019】

特に、好ましいグルコシル基受容体は、グリコーゲンなどの分枝状多糖である。そのような分枝状のグルコシル基受容体は、鎖を伸長させることができる末端を2つ以上有する。従って、グリコーゲン鎖は、グルコシル基が転移し得る分枝を約7から12%有する。

【0020】

驚くべきことに、今回、アミロスクラーゼにより触媒される $\alpha-1, 4$ -グルカンの合成において、反応混合物中における鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端のスクロースに対するモル比および/またはグルコシル基受容体のスクロースに対する重量比を規定された最小値にした場合、多分散度が小さい多糖調製物をもたらす副反応よりも優先すると考えられる。多分散度は、スクロース濃度が一定の場合、受容体の濃度が増大するにつれて低下する傾向を示す。

【0021】

便宜上、反応混合物中における鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端とスクロースとのモル比は、少なくとも1:1000である。好ましくは、モル

比は少なくとも5:1000であり、特に好ましくは少なくとも1:100である。鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端とスクロースとのモル比の上限はあまり重要ではなく、便宜的には約1:50から1:25である。

【0022】

グルコシル基受容体とスクロースとの重量比は、便宜的には少なくとも1:50であり、例えば少なくとも2:50であり、あるいは少なくとも5:50である。最適な重量比は受容体のタイプに依存する。分枝状の多糖受容体の場合、与えられたスクロース濃度での反応混合物において必要とされる受容体の量は、一般に、非分枝の多糖受容体またはほんのわずかに分枝している多糖受容体の場合よりも少ない。従って、重量平均分子量M_wが約160000g/molであるグリコーゲンが使用される場合、受容体とスクロースとの比が少なくとも2.5:50であることが好都合であることが証明され、一方、M_wが約5000から6000g/molであるデキストリンの場合、受容体とスクロースとの重量比が少なくとも5:50から10:50であることが好ましい。

【0023】

所定のスクロース濃度および所定のグルコシル基受容体の場合、選ばれたグルコシル基受容体の濃度が高いほど、本発明の方法により得られる多糖の分子量は小さくなる。このようにグルコシル基受容体のスクロースに対する重量比を好適に選ぶことによって、最終生成物の分子量もまた制御することができる。

【0024】

反応混合物におけるアミロスクラーゼの基質として使用されるスクロースの絶対的な濃度は重要ではない。しかし、使用量は、便宜的には50% (w/v) を超えない。これは、この濃度を超えると、溶液の粘度が大きくなりすぎ、反応速度が急激に低下するからである。好ましくは、反応混合物中のスクロース濃度は1から30% (w/v) の間である。

【0025】

鎖伸長反応のための最適な条件、例えば反応混合物中における鎖の伸長に利用可能なグルコシル基受容体末端のスクロースに対するモル比、反応混合物中におけるグルコシル基受容体のスクロースに対する重量比、および反応混合物中にお

けるスクロース濃度は、簡単な実験によって問題なく決定することができる。

【0026】

アミロスクラーゼにより触媒される α -1, 4-グルカンの合成において、フルクトースを反応混合物に添加したときに、多分散度が小さい多糖が得られることがさらに見出された。これは、フルクトースの添加により、多分散度が大きい多糖調製物を生じさせる妨害的な副反応が阻害されていると考えられる。フルクトースが存在することにより導入される効果は、グルコシル基受容体のスクロースに対するモル比および重量比が上記に規定された最小値であるか否かに関係なく認められる。フルクトースの添加は分子量分布をさらにより狭くし、すなわち、結果として生じる最終生成物の多分散度をより小さくする。しかし、その代わり、収率が若干低くなる。

【0027】

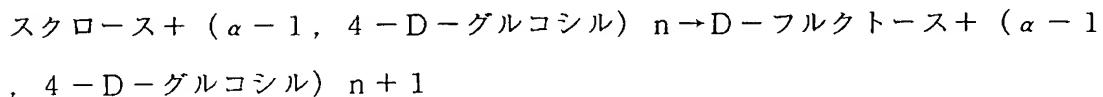
便宜上、フルクトースは、少なくとも10 mMの濃度で反応混合物に添加される。好ましくは、フルクトースは、少なくとも50 mMの濃度で、好ましくは100から800 mMの濃度で添加される。

【0028】

本発明の方法により、使用されるグリコシル基受容体の分子量を2倍から3倍に大きくすることが問題なく達成される。従って、本発明の方法において使用される受容体の分子量もまた、最終生成物の所望する分子量に依存する。しかし、鎖伸長反応の反応速度は受容体の重合度の増大とともに大きくなるため、便宜的には、重量平均分子量 M_w が少なくとも 0.5×10^3 g/mol、好ましくは少なくとも 4×10^3 g/mol、特に好ましくは少なくとも 1×10^5 から 1×10^6 g/molである受容体が使用される。結果として生じる反応生成物の多分散度は、使用される受容体物質の均一性によっても損なわれるため、できる限り小さい多分散度を有する受容体分子を使用することもまた勧められる。

【0029】

下記の反応式：



に従って、D-フルクトースを遊離して、スクロース分子のグルコシル基を受容体分子に転移し、 $\alpha-1$ 、4-グルカン鎖を生成し得る酵素はすべて、アミロスクラーゼとして使用することができる。好ましくは、原核生物から得られるアミロスクラーゼが使用され、特にナイセリア属の細菌から得られるアミロスクラーゼが使用される。好適なアミロスクラーゼは、例えば、*N. sicca*、*N. anis*、*N. cinerea*、*N. perflava*、*N. subflava*、*N. denitrificans*および*N. polysaccharaea*の細菌種に存在するアミロスクラーゼである。好ましくは、*N. polysaccharaea* ATCC43768から得られるアミロスクラーゼが使用される。例えば、*N. polysaccharaea* ATCC43768から得られるアミロスクラーゼが使用される。

【0030】

使用されるアミロスクラーゼは、アミロスクラーゼが自然界で合成される生物 (MacKenzie, C. R. ら、Can. J. Microbiol.、24: 357~362; 1978) から直接単離することができ、あるいはWO95/31553に記載されているように、アミロスクラーゼは遺伝子工学的により産生することができる（組換えアミロスクラーゼ）。この酵素はまた、転写および翻訳のインビトロシステムを使用して無細胞条件下で産生させることもできる。

【0031】

アミロスクラーゼは、粗酵素として、あるいは部分精製された形態だけでなく、高度に精製された形態でも使用することができる。好ましくは、高度に精製されたアミロスクラーゼが使用される。「高度に精製されたアミロスクラーゼ」という用語は、特に、純度が少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、特に好ましくは少なくとも95%であるアミロスクラーゼを表すために用いられる。

【0032】

高度に精製されたアミロスクラーゼを本発明の方法において使用することは、酵素が単離された菌株、例えば微生物の残渣が酵素に含まれないという利点を有

する。例えば、高度に精製されたアミロスクラーゼは、他の望ましくない酵素、例えばアミラーゼなどの多糖分解酵素を含まない。高度に精製されたアミロスクラーゼの使用は、また、不必要的構成成分を含まない規定された反応媒体が、また、より精密に規定された生成物を提供するので、食品産業および製薬産業における使用には好都合である。これにより、食品産業および製薬産業におけるこれらの生物工学的に製造された生成物に関する認可過程が、特に、これらの生成物が遺伝子組換え微生物の何らかの痕跡を有さない場合、あまり複雑にならない。

【0033】

好ましくは、組換えアミロスクラーゼは、例えばWO95/31553に記載されているように使用される。そのような組換えアミロスクラーゼは、発現したタンパク質の規定された性質を改変するために、適する場合には変異、例えば挿入、欠失および置換によってもまた自然界に存在するアミロスクラーゼに関して遺伝子的に改変することができる。従って、例えば、アミロスクラーゼは、例えば親和性クロマトグラフィによるその特異的な結合特性により融合タンパク質の精製をより容易にできるポリペプチド配列を伴った融合タンパク質として発現させることができる（例えば、Hoppら、Bio/Technology、6（1988）、1204～1210；Sassenfeld、Trends Biotechnol. 8（1980）、88～93を参照のこと）。特に好ましくは、宿主細胞によって栄養培地に分泌されるアミロスクラーゼが使用される。その結果、分泌された酵素を上清から得ることができるので、細胞消化および酵素のさらなる精製が不要である。アミロスクラーゼは、N. polysaccharareaのように自然に分泌させることができ、あるいは酵素をシグナルペプチドと一緒に発現させることによって分泌させることができる。これは、シグナルペプチドの助けによって、酵素が宿主生物の細胞膜を通過できるからである。

【0034】

アミロスクラーゼは、遊離形態で使用するか、あるいは支持体に固定化することができる。アミロスクラーゼの固定化は、酵素が簡便な方法で反応媒体から回収することができ、かつ反復的に使用できるという利点をもたらす。酵素の精製は一般に費用および時間がかかるため、酵素の固定化および再使用はかなりのコ

スト節約を可能にする。さらなる利点は、タンパク質残渣を含有しない反応生成物の純度である。好適な支持体は、例えば、アガロース、アルギン酸塩、セルロース、ポリアクリルアミド、シリカまたはナイロンであり、支持体に対する結合は共有結合または非共有結合を介する。

【0035】

使用されるアミロスクレーゼの量は、通常、0.1から100U/m lの間であり、好ましくは1から50U/m lの間であり、特に好ましくは2から25U/m lの間である。

【0036】

本発明の多糖は、便宜的には、インビトロにおいて、4から9の間のpH、好ましくは5.5から7.5の間のpHを有する緩衝剤を含まない水系または緩衝剤で処理された水系で製造される。好適な緩衝剤系は、例えば、クエン酸塩緩衝剤、マレイン酸塩緩衝剤および酢酸塩緩衝剤である。

【0037】

反応温度は、便宜的には10から60℃の間であり、好ましくは25から45℃の間である。

【0038】

反応は、便宜的には、スクロースの変換が完了するまで行われる。通常、これに必要な反応時間は1から150時間の間であり、例えば、10から100時間の間である。

【0039】

本発明により生成される多糖は、多くの場合、水にやや溶けにくい。従って、例えば、遠心分離によって容易に反応混合物から分離することができる。水溶性多糖または部分的に水に可溶な多糖は、例えば、エタノール沈殿によって、あるいは凍結させることによって単離することができる。

【0040】

本発明の方法により、多分散度が小さい $\alpha - 1$ 、4-グルカン鎖含有多糖の簡便で安価な製造が可能になる。本発明の方法は、最終生成物の分子量が良好に制御されることおよび優れた再現性において抜群である。これにより、一定した均

一性および純度、従って高品質の製品を製造することが可能になる。これは、さらなる工業的使用には非常に重要である。結果として生じた生成物は、処理に必要とされる工程パラメータを各処理バッチに関して新たに最適化する必要がないので、安価に処理することができる。

【0041】

本発明をより詳しく下記の実施例によって説明する。

【0042】

実施例1：

アミロスクレーゼの精製

アミロスクレーゼを産生させるために、ナイセリアポリサッカレア (*Neisseria polysaccharea*) のアミロスクレーゼを含有するベクター pNB2 で形質転換された大腸菌細胞を使用した (WO 95/31553)。

ナイセリアポリサッカレアのアミロスクレーゼを分泌するこの大腸菌細胞の一晩培養物を遠心分離して、細胞を約 1/20 容量の 50 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)、10 mM の DTT (ジチオスレイトール)、1 mM の PMSF (フェニルメチルスルホニルフッ化物) に再懸濁した。次いで、細胞を、フレンチプレスを 16000 p.s.i で使用して 2 回分解した。次いで、1 mM の MgCl₂、および 12.5 ユニット m⁻¹ の最終濃度でのベンゾナーゼ (Merck; 100000 ユニット; 250 ユニット μl⁻¹) を細胞抽出物に加えた。次いで、混合物を、37 °C で穏やかに攪拌しながら少なくとも 30 分間インキュベーションした。抽出物を氷上に少なくとも 1.5 時間静置した。次いで、上清が比較的透明になるまで、約 40000 g で 30 分間遠心分離した。ポア径が 0.45 μm の PVDF 膜 (Millipore 社の「Durapore」または類似品) による予備濾過を行った。抽出物を 4 °C で一晩静置した。疎水性相互作用 (HIC) クロマトグラフィを行うために、固体の NaCl を抽出物に加え、濃度を 2 M の NaCl にした。混合物を約 40000 g において 4 °C で 30 分間再び遠心分離した。次いで、抽出物を、ポア径が 0.22 μm である PVDF 膜 (Millipore 社の「Durapore」または類似品) で濾過するこ

とによって大腸菌の最終残渣を除いた。濾過した抽出物をブチルセファロース-4Bカラム (Pharmacia) (カラム容量: 93ml、長さ: 17.5cm) で分離した。1から5ユニット⁻¹のアミロスクラーゼ活性を有する約50mlの抽出物をカラムに加えた。次いで、非結合タンパク質を150mlの緩衝液B (緩衝液B; 50mMのクエン酸ナトリウムpH6.5、2MのNaCl) でカラムから洗浄した。次いで、自動ポンプシステム (FPLC、Pharmacia) を使用して生成される減少する線状NaCl勾配 (1.5ml min⁻¹の流速での、433mlの容量で、50mMクエン酸ナトリウムにおける2Mから0MへのNaCl) を使用してアミロスクラーゼを溶出した。アミロスクラーゼは0.7から0.1Mの間のNaClで溶出された。この画分を集め、PD-10-Sephadexカラム (Pharmacia) で脱塩し、8.7%グリセロールで安定化し、アミロスクラーゼ活性について試験し、その後、貯蔵緩衝液 (8.7%グリセロール、50mMクエン酸塩) において凍結した。

【0043】

実施例2:

アミロスクラーゼ活性の測定

精製タンパク質または粗タンパク質抽出物を、5%スクロース、0.1%グリコーゲンおよび100mMクエン酸塩pH6.5を含有する1mlのアッセイ溶液に様々な希釈度で加え、37℃でインキュベーションした。5分後、10分後、15分後、20分後、25分後および30分後に、それぞれ100μlをこのアッセイ溶液から取り出し、95℃で10分間直ちに加熱することによってアミロスクラーゼ酵素活性を停止させた。共役した酵素試験を使用して、アミロスクラーゼによりスクロースから放出されたフルクトースの量を光度測定法で求めた (M. Stittら、Methods in Enzymology, 174: 518~552; 1989)。このために、1μlから10μlの不活性サンプルを、50mMのイミダゾール緩衝液pH6.9、2mMのMgCl₂、1mMのATP、0.4mMのNADおよび0.5U/mlのヘキソキナーゼの1mlに加えた。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (Leukonostoc mesenteroides由来) およびホスホグルコースイソメラーゼを続

いて加えた後、340 nmにおける吸光度変化を測定した。次いで、放出されたグルコースの量を、ランベルトーベール則を使用して計算した。得られた結果がサンプリング時点と関係付けられれば、酵素ユニット数Uを決定することができる。

【0044】

1 Uは、上記の条件下で1 μ mol／分のフルクトースを遊離させるアミロスクラーゼの量として定義される。

【0045】

実施例3：

多糖の製造

3.1 多糖調製物を製造するために、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液pH 6.5、0.02%アジ化ナトリウムの10 ml中において、アミロスクラーゼを、グルコシル基受容体としてのグリコーゲン (Merck; 160000のMw、約1.4の多分散度) および基質としてのスクロースの様々な濃度で、スクロースの変換が完了するまで、すなわち少なくとも48時間、37°Cでインキュベーションした。アミロスクラーゼを5から20 U/mlの濃度で加えた。グリコーゲンを用いない平行したコントロールサンプルを、それ以外は同一の条件のもとで処理した。

【0046】

沈殿した多糖を遠心分離して除き (15分、1200 g)、水に再懸濁することによって洗浄し、遠心分離した。これを2回繰り返した。ペレットを-20°Cで凍結し、0.34 mbarおよび25°Cの周囲温度で凍結乾燥した (Alphal.4凍結乾燥器、Christ)。乾燥時のサンプル温度は-25°Cであった。

【0047】

結果として生じた生成物をゲル透過クロマトグラフィ (GPC) によって分析した。

【0048】

操作は、DIN55672-1に規定される通りに行った。すべての測定は、

溶離液として0.09MのNaNO₃を使用して、ジメチルスルホキシド(DM SO)中で行った。GPCは、PSゲルカラム(10³、10⁵および10⁶Å; PSS、Mainz、「SDV 10μ」型)のカラム組合せを使用した。質量画分を検出するために、Shodexの「RI71」型示差屈折計を使用した。BischoffのHPLC Compact Pump型ポンプを使用した。流速は1ml/分であった。PSS、Mainz、の線状プルランを検量に使用した(サンプルは分枝状構造を有しているので、測定結果は絶対値ではなく、相対的な大きさである。しかし、その相対的な大きさは、サンプルの一定した分枝度の範囲内で比較可能である)。PSS、「Win-GPC scientific 4.02」のGPCソフトウェアは、DIN55672-1に完全に準拠しており、その妥当性を完全に確認した。従って、データ処理工程の正しさは、システムとは無関係に再現性があった。1000g/mol未満の値を有するモル質量は、評価の際には考慮しなかった。

【0049】

結果を下記の表1に示し、図1に図示する(w_iおよびW_iは、i番目のポリマー画分の正規化質量画分および相対的質量画分を表す)。垂直な点線は、グルコシル基受容体として使用されたグリコーゲンの初期分子量を示す。

【0050】

【表1】

グルコーゲン		スクロース (%)		20		40	
mg/ml	M _w	M _n	In	M _w	M _n	In	M _w
0	67 170	2 129	32	7 248	1 953	3.7	4 210
1	224 400	17 460	13	101 700	7 894	13	11 250
2.5	251 400	28 080	9	95 670	4 701	20	
5	315 300	71 650	4.4	248 500	24 785	10.7	113 300
10	303 500	235 600	1.3	316 900	76 380	4.1	247 900
20	244 100	195 600	1.3	317 000	243 600	1.3	319 400

M_w 重量平均分子量
M_n 数平均分子量
In 多分散度 (M_w/M_n)

【0051】

これらの結果は、結果として生じた多糖の多分散度が、スクロース濃度が一定

で、グリコーゲン濃度が増大している場合に急激に低下していることを示している。

【0052】

3. 2 さらなる実験において、アミロスクラーゼ (5 U/m l) を、0. 1 M酢酸ナトリウム緩衝液 pH 6. 5、0. 02% アジ化ナトリウム、5% スクロース (w/v) の 10 m lにおいて、様々な濃度のグリコーゲンとともに、フルクトース (400 mMの初期濃度) の存在下またはフルクトースの非存在下、スクロースの変換が完了するまで (少なくとも 48 時間) 37°Cでインキュベーションした。酵素を含まない平行したコントロールサンプルを、それ以外は同一条件のもとで処理した。結果として生じた多糖生成物を、3. 1 に記載されているように遠心分離して除き、洗浄し、凍結乾燥して、GPCで分析した。結果を図 2 a に図示する。図 2 aにおいて、W i は上記の意味を有する。垂直な点線は、グルコシル基受容体として使用されたグリコーゲンの初期分子量を示す。

【0053】

これらの結果は、結果として生じた多糖の多分散度が、スクロース濃度が一定で、グリコーゲン濃度が増大している場合に低下していることを示している。フルクトースが存在する場合、多分散度のさらなる低下が認められる。

【0054】

3. 3 3. 2 に記載されている実験を、グリコーゲンの代わりに、デキストリン (Sigma, No. D-4894、タイプ IV、ジャガイモ由来、Mw 6650) を使用した以外は同一条件のもとで繰り返した。フルクトースの存在下および非存在下でスクロースの変換が完了するまで (少なくとも 48 時間) 37°Cでインキュベーションした後、結果として生じた多糖生成物を、上記に記載されているように遠心分離して除き、洗浄して凍結乾燥した。酵素を含まない平行したコントロールサンプルを、それ以外は同一条件のもとで処理し、上記のように処理して分析した。結果を図 2 に図示する。図 2において、W I は上記の意味を有する。垂直な点線は、グルコシル基受容体として使用されたデキストリンの初期分子量を示す。

【0055】

これらの結果は、結果として生じた多糖の多分散度が、スクロース濃度が一定で、デキストリン濃度が増大している場合に低下していることを示している。フルクトースが存在する場合、多分散度のさらなる低下が認められる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

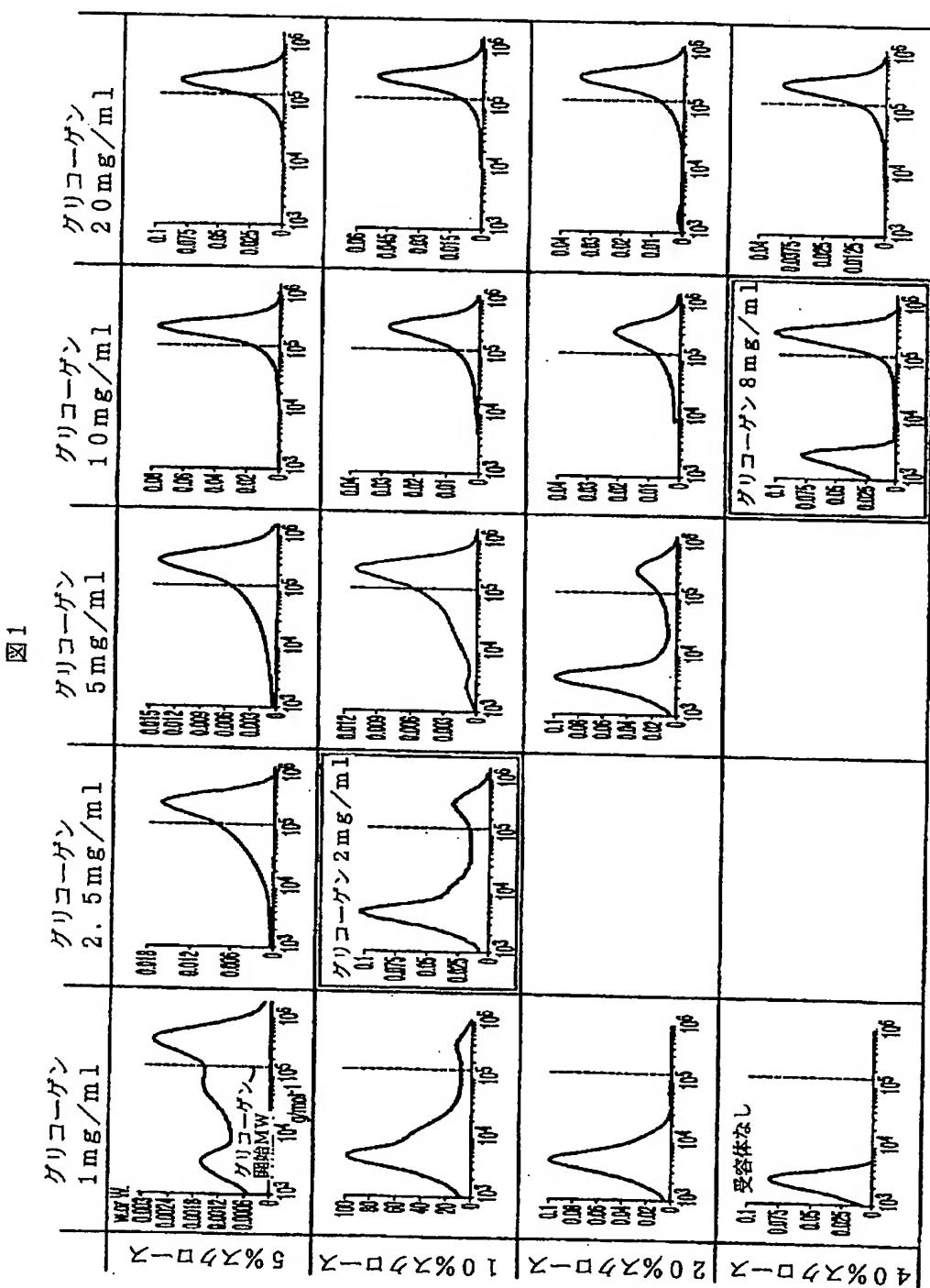
図1は、アミロスクラーゼの存在下でのグルコシル基受容体としてのグリコーゲンとスクロースとの反応における、グリコーゲン濃度およびスクロース濃度を関数とする $\alpha - 1, 4$ - グルカン鎖含有多糖の分子量分布を示す。

【図2】

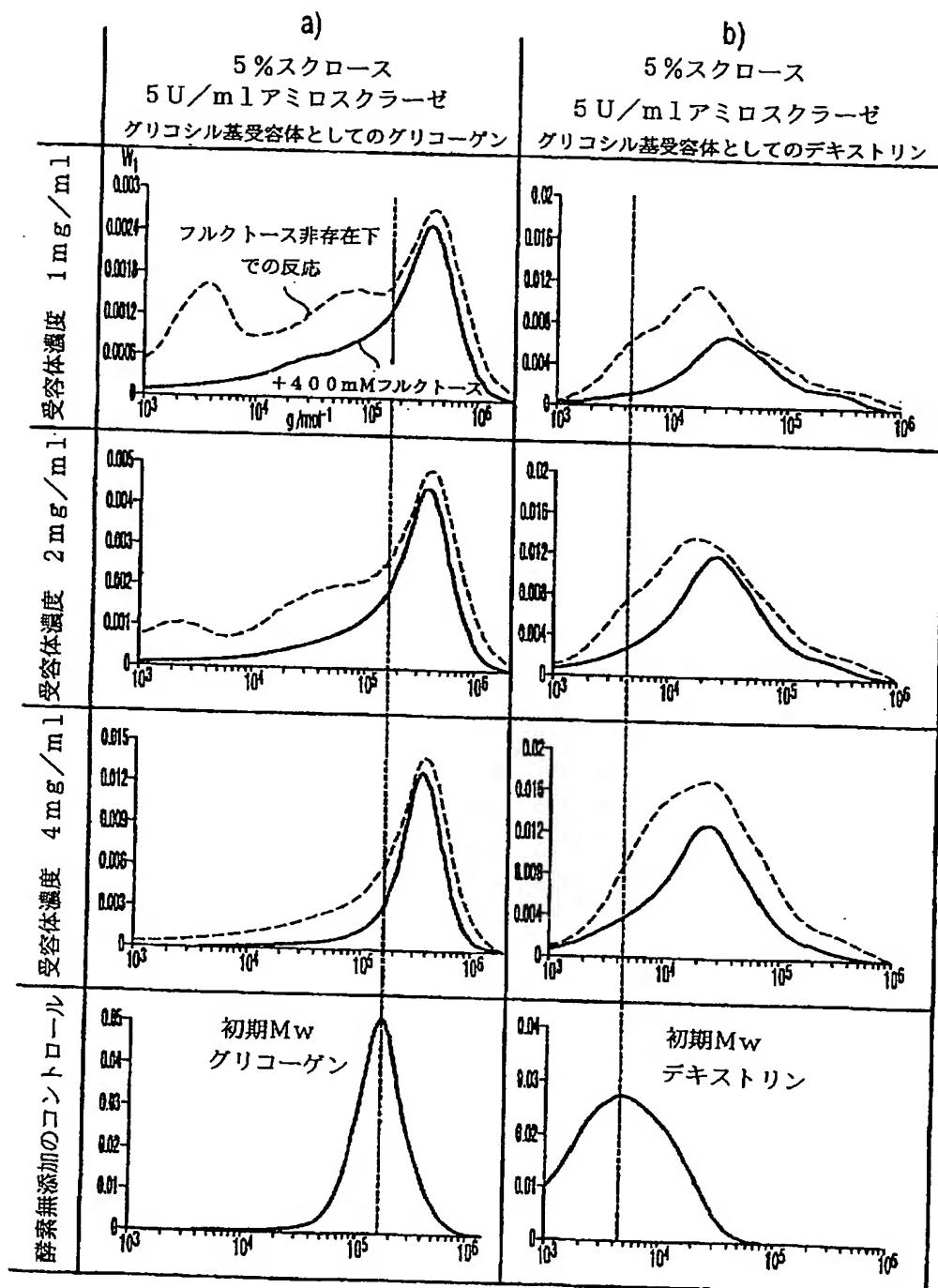
図2 a は、アミロスクラーゼ存在下でのグリコーゲンとスクロースとの反応における、フルクトースの存在下および非存在下でのグリコーゲン濃度およびスクロース濃度を関数とする $\alpha - 1, 4$ - グルカン鎖含有多糖の分子量分布を示す。

図2 b は、アミロスクラーゼ存在下でのデキストリンとスクロースとの反応における、フルクトースの存在下および非存在下でのデキストリン濃度およびスクロース濃度を関数とする $\alpha - 1, 4$ - グルカン鎖含有多糖の分子量分布を示す。

【図 1】



【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 99/09299
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P19/18 C08B37/00 A61K9/20 //((C12P19/18,C12R1:36))		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P C08B A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKADA G ET AL: "NEW STUDIES ON AMYLOSUCRASE, A BACTERIAL ALPHA-D-GLUCOSYLASE THAT DIRECTLY CONVERTS SUCROSE TO A GLUCOGEN-LIKE ALPHA-GLUCAN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC., vol. 249, no. 1, 10 January 1974 (1974-01-10), pages 126-135, XP000867741 ISSN: 0021-9258 cited in the application	11
A	the whole document	1-10
A	US 5 229 277 A (DAY DONAL F ET AL) 20 July 1993 (1993-07-20) the whole document	1-12
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the International filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other specific documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
Z document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 7 April 2000		Date of mailing of the International search report 26/04/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l. Appl. No. PCT/EP 99/09299
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with index or where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOLOGICAL ABSTRACTS 'Online' Abstract PREV199800075745, December 1997 (1997-12) XP002134915 abstract & LEE C Y ET AL: "Production of glucooligosaccharides by an acceptor reaction using two types of glucansucrase from <i>Streptococcus sobrinus</i>" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 19, no. 12, December 1997 (1997-12), pages 1227-1230, KFW, SURREY, GB ISSN: 0141-5492</p> <p>WO 95 31553 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); BUETTCHER VOLKE) 23 November 1995 (1995-11-23) cited in the application abstract; examples 4,5</p>	10
X		11
A		1-10
3		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 99/09299

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5229277 A	20-07-1993	NONE	
WO 9531553 A	23-11-1995	DE 4417879 A DE 4447388 A AU 699552 B AU 2614195 A CA 2190149 A EP 0759993 A HU 76087 A JP 10500297 T	23-11-1995 27-06-1996 10-12-1998 05-12-1995 23-11-1995 05-03-1997 30-06-1997 13-01-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マークコード(参考)
C 12 R 1:01)		C 12 R 1:01)	
(72)発明者	プロヴァールト、ニコラス		
ドイツ国	マーク14163 ベルリン バル		
フォリエハイデ	31		
F ターム(参考)	4B050 CC03 DD02 FF05 FF09 FF11		
	LL05		
	4B064 AF12 CA21 CB30 CC03 CC24		
	CD09 CD19 DA10		